

Infektiologie und Mikrobiologie
(Schwerpunkt Virologie)

Redaktion: B. Weber

Spezifische Immuntherapie und Vakzination als Störfaktoren in der serologischen Diagnostik

Immunotherapy and vaccination: interfering factors in serological diagnostics

Claudia Reinheimer* und Hans Wilhelm Doerr

Institut für Medizinische Virologie, Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt/Main, Frankfurt a.M., Deutschland

Zusammenfassung

Qualitative und quantitative serologische Verfahren können durch Interferenzen gestört sein. Wir konnten in einem exemplarischen Fall anhand des Influenza A/H1N1v-Hämagglutinationshemmtests (H1N1-HHT) zeigen, dass auch Hyposensibilisierungstherapie und Vakzination zu Interaktionen in der serologischen Diagnostik führen und die Aussagekraft des H1N1-HHT massiv beeinträchtigen. Vor dem Hintergrund, dass Hyposensibilisierung und Vakzination im Klinik- und Praxisalltag häufig erbrachte Leistungen darstellen, erscheint dieser Umstand berichtenswert.

Schlüsselwörter: H1N1; Hyposensibilisierung; Störfaktoren in der serologischen Diagnostik; Vakzination.

Abstract

A variety of factors are known to influence qualitative and quantitative serological assays. Here, we discuss such pitfalls in serology emerging in a case of influenza A/H1N1v-hemagglutination inhibition test (H1N1-HHT) subsequent to hyposensitization and vaccinations. Assuming that hyposensitization and vaccinations are frequently provided services, their potential interference with serological assays should be considered.

Keywords: disturbing factors in serodiagnosis; H1N1; hyposensitization; vaccination.

*Korrespondenz: Claudia Reinheimer, Institut für Medizinische Virologie, Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt/Main, Paul-Ehrlich-Straße 40, 60596 Frankfurt a.M., Deutschland
Tel.: +49 69/6301-83062
Fax: +49 69/6301-83061
E-Mail: claudia.reinheimer@kgu.de

Einleitung

Eine Vielzahl von Störfaktoren kann die qualitative und quantitative Analyse des Immunstatus in der serologischen Diagnostik einer Infektionskrankheit beeinträchtigen. So können beispielsweise nicht nur Borrelien, sondern auch Diabetes mellitus eine falsch-positive Lues-Serologie bedingen [1, 2]. Weiterhin sind falsch-positive HIV- und HCV-Serologien nach Influenza-Vakzination dokumentiert [3–5].

Ferner sind Fälle dokumentiert, bei denen es bei akuter CMV- und Parvovirus B19-Infektion zu Interaktionen in der Labordiagnostik kam [6–8]. Darüber hinaus sind auch Autoantikörper als potenzielle Störfaktoren in der serologischen Diagnostik bekannt [9].

Nachfolgend berichten wir über einen Fall, bei dem der Immunstatus gegenüber Influenza A/H1N1v mit dem Hämagglutinationshemmtest (HHT) abgeklärt wurde, und, bei dem sich eindrucksvoll zeigte, dass Hyposensibilisierung und Vakzination als Störfaktoren die serologische Diagnostik beeinflussen.

Kasuistik

Anamnese

Es handelt sich bei dem Probenspender um einen 30-jährigen in Deutschland lebenden Arzt indonesischer Abstammung. Zum Entnahmezeitpunkt bestand keine akute Erkrankung. Anamnestisch ist, abgesehen von einer Pollinose mit gelegentlichen asthmatischen Episoden, welche bedarfsmäßig mit einem inhalativen β -Mimetikum therapiert werden, keine chronische Erkrankung bekannt. Der Probenspender ist Nichtraucher und verneint Alkohol- sowie Drogenkonsum. Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme befand er sich in einem Therapieschema zur Hyposensibilisierung der Pollinose, welches sich aus sechs Injektionen mit jeweils einwöchigem, therapiefreiem Intervall zusammensetzte. Zum Entnahmezeitpunkt lag die fünfte Injektion zwei Tage zurück. Der Proband hatte bis dahin keine H1N1-Vakzination erhalten, sich aber in den Jahren zuvor gegen die saisonale Influenza immunisieren lassen. Anamnestisch sind weder

beim Serumspender noch in dessen Familie Autoimmunerkrankungen bekannt. Die für ein autoimmunologisches Geschehen sprechenden Symptome wurden abgefragt und umfassten Erkrankungen aus dem rheumatoiden Formenkreis, insbesondere auch Vaskulitiden und Kollagenosen sowie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und glutensensitive Sprue. Beim Spender selbst wie auch in seiner Familie sind keine autoimmunologischen Hauterkrankungen bekannt (z.B. Psoriasis oder Pemphigus vulgaris).

Hyposensibilisierungssuspension und -schema

Die beim Serumspender zur Hyposensibilisierung genutzte Suspension enthält selektiv gereinigte Allergenextrakte aus Pollen von Birke (*Betula* spp.), Erle (*Alnus* spp.) und Hasel (*Corylus* spp.). Durch Behandlung mit Glutaraldehyd wurden die Allergene zu Allergoiden modifiziert und sind an L-Tyrosin adsorbiert. Weitere Adjuvantien sind Phenol, Glycerol, Natriumchlorid, Natriummono- und -dihydrogenphosphat.

Das Therapieschema sieht insgesamt sechs Injektionen vor. Als Basisschema werden drei Injektionen in aufsteigender Dosierung [Standardised Units (SU)] empfohlen, wobei die erste Injektion 300 SU/0,5 mL Suspension und die letzte Injektion die Maximaldosis (2000 SU/0,5 mL) enthält. Die Folgebehandlung besteht aus drei Injektionen der Maximaldosis (s.o.). Der Abstand zwischen den Injektionen beträgt idealerweise eine Woche.

Der Serumspender wurde schemakonform therapiert.

Untersuchungsmethoden

Die Bestimmung des Immunstatus erfolgte mittels HHT wie beschrieben [10]. Daneben wurden weitere serologische Untersuchungen durchgeführt: Bestimmung der Influenzavirus A – Antikörper mit der indirekten Immunfluoreszenz (IFT) [11] und der HCMV- sowie EBV-Antikörper mit dem indirekten ELISA bzw. IFT [12, 13].

Die Testung auf Rheumafaktor (RF) erfolgte mittels Polystyrol-Partikeln, die mit Immunkomplexen, bestehend aus humanem Immunglobulin und Anti-human IgG vom Schaf,

beladen sind. Sie bilden bei Mischung mit RF-haltigen Proben Aggregate, an denen eingestrahktes Licht gestreut wird. Die Intensität des Streulichts ist abhängig von der jeweiligen Konzentration des Proteins in der Probe. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich mit einer Referenzprobe bekannter Konzentration [14].

Ergebnisse

Die Ergebnisse im H1N1-HHT sind chronologisch gemeinsam mit Hyposensibilisierung und Vakzination in Tabelle 1 dargestellt. Gleiche Bedingungen wurden zu jeder Blutentnahme (kein Alkoholkonsum, kein Drogen- und Nikotinkonsum) sichergestellt.

Bereits in der ersten Untersuchung zeigte die antigenfreie Serumkontrolle eine Agglutination der Testerythrozyten (Truthahn), so der HHT nicht ablesbar war.

Dieses unspezifische Ergebnis des Spenders gab Anlass zur Ermittlung eines Kausalzusammenhangs. Als einziger interagierender Faktor im HHT konnte die Hyposensibilisierungstherapie eruiert werden. Zum Ausschluss heterophiler Antikörper im Rahmen einer frischen EBV-Infektion schloss sich der Paul-Bunnell-Test an, welcher ein negatives Ergebnis ergab. Auch im EBV-IgM-Immunfluoreszenztest (IFT) zeigte sich ein negatives Resultat, eine frische EBV-Infektion konnte damit ausgeschlossen werden [15]. Serologisch fand sich eine früher abgelaufene EBV-Infektion. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Rheumafaktoren, welche sich mit 9,38 IU/mL im Referenzbereich befanden.

Der parallel durchgeführte Influenza-IFT zeigte ein positives Ergebnis. Es handelte sich dabei jedoch nicht um einen H1N1v-spezifischen IFT, da sowohl H1N1 als auch H2N3 erfasst werden. Die Wertigkeit der Testergebnisse im IFT ließ sich zunächst nicht sicher einordnen, da anamnestisch mehrere Vakzinationen gegen saisonale Influenza genannt wurden. Dem Impfpass konnten Influenzaimpfungen für die Saison 2005/06 und 2008/09 entnommen werden, die enthaltenen Spaltantigene gehen aus den Beipackzetteln der Hersteller hervor und sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 1 Zusammenstellung der Ergebnisse von H1N1-HHT und antigenfreier Serumkontrolle in Chronologie mit Hyposensibilisierung und Vakzination.

Untersuchungstag	Ereignis	Serumkontrolle	H1N1v-HHT Bewertung
Tag-3	Hyposensibilisierung Termin 5/6		
Tag 0	Blutentnahme	Agglutination	Unspezifisch
Tag 4	Hyposensibilisierung Termin 6/6		
Tag 7	Blutentnahme	Agglutination	Unspezifisch
Tag 14	Blutentnahme	Sedimentation	Negativ
Tag 17	Booster-Vakzinationen Hepatitis A und B FSME		
Tag 21	Blutentnahme	Agglutination	Unspezifisch
Tag 28	Blutentnahme	Sedimentation	Negativ
Tag 35	Blutentnahme	Sedimentation	Negativ

Tabelle 2 Inaktivierte Influenza-Spaltvakzine für Saison 2005/06 und 2008/09 (PEI).

Saison 2005/06	Saison 2008/09
A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)
A/California/7/2004 (H3N2)	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like strain
B/Malaysia/2506/2004	B/Florida/4/2006-like strain

Die unspezifischen (Agglutination in der Serumkontrolle) und definitiven (fehlende Agglutination in der Serumkontrolle) Serumproben wurden anschließend dem Röteln-HHT zugeführt. Es zeigten sich sowohl für die unspezifischen Proben als auch für die definitiv-negativen Proben ein definitives positives Ergebnis (nach vollständiger, schemakonformer MMR-Vakzination im Kindesalter).

Weiterhin erfolgte die Feststellung des CMV-Serostatus. IgM und IgG waren negativ, damit bestand kein Hinweis auf akute bzw. früher abgelaufene CMV-Infektion.

Diskussion

Die spezifische Immuntherapie findet Anwendung bei IgE-vermittelten Erkrankungen wie beispielsweise der allergischen Rhinitis oder Konjunktivitis. Das Prinzip besteht in der repetitiven subkutanen Gabe relevanter Allergene in aufsteigender Dosierung [16].

Die Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie sind nicht hinreichend geklärt. Diskutiert werden unter anderem die Modulation der TH2-Zell-Funktion [17] sowie die Downregulation von CD23, einem niedrigaffinen IgE-Rezeptor [18]. Darüber hinaus konnte nach vollendeter Immuntherapie ein erhöhter Spiegel an IL-10, einem Zytokin mit potenten antiallergischen Eigenschaften, gemessen werden [19].

Die unspezifischen und definitiven Testergebnisse des Spenderserums legen eine Beeinflussung des HHT durch die spezifische Immuntherapie nahe.

Fraglich ist dabei, ob beispielsweise IL-10, welches physiologischerweise antiallergisch bzw. -inflammatorisch wirkt [20–22], den HHT inhibierend beeinflussen kann.

Wie eingangs erwähnt, sind darüber hinaus auch Autoantikörper als Störfaktoren bekannt [9]. Zwar konnten Rheumafaktoren ausgeschlossen werden, doch sollten atopische Erkrankungen ebenfalls in die Betrachtung einfließen. Die allergische Rhinitis (Pollinose) stellt neben allergischem Asthma bronchiale, atopischer Dermatitis und dyshidrotischem Ekzem eine Entität des atopischen Formenkreises dar. Es ist bekannt, dass genannte vier Erkrankungen mit Autoantikörpern gegen CD28 assoziiert sind [23], was aufgrund dessen bei dem Indexpatienten angemessen in die Überlegungen zu autoimmunologisch bedingten Interaktionen in der serologischen Diagnostik einbezogen werden muss.

Weiterhin zeigte sich auch nach den Booster-Vakzinationen (Hepatitis A und B, FSME) zwischen der vierten und

fünftens Blutentnahme ein unspezifisches Testergebnis im HHT.

Unsere Beobachtung, dass die Vakzination zur Testinteraktion führen kann, deckt sich mit dokumentierten Fällen falsch-positiver Screenings auf HIV-, HTLV- und HCV-Antikörper nach Influenza-Vakzination [3–5, 24]. Ob die Vakzination über den gleichen immunologischen Mechanismus ein nicht eindeutig interpretierbares Testergebnis erzeugt hat oder andere mit ihr in Zusammenhang stehende Faktoren Einfluss auf den HHT genommen haben, bleibt zu eruieren.

Zwar führt die aktive Immunisierung, so geschehen im Rahmen genannter Booster-Impfungen, zur B-Zellstimulation mit konsekutiver Antikörper-Bildung, doch ist fraglich, ob additiv nicht auch Kaskaden aktiviert werden, welche inhibitorischen Einfluss auf den HHT haben.

Darüber hinaus ist die generelle Aussagekraft des HHT bei einem gleichzeitig bestehenden Lymphom zu hinterfragen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur ophthalmologische Lymphome, sondern auch extraokuläre Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) und Morbus Hodgkin mit einem alterierten IL-10-Serumspiegel einhergehen [25–32]. Wie eingangs diskutiert, sollte die Möglichkeit einer direkten oder indirekten Beeinflussung des HHT durch IL-10 in Betracht gezogen werden und deshalb das serologische Testergebnis bei gleichzeitig bestehendem Lymphom kritisch beurteilt werden.

Wir konnten zeigen, dass Vakzination und spezifische Immuntherapie vorübergehend als Störfaktoren im H1N1v-HHT fungieren. Vor dem Hintergrund, dass sowohl die spezifische Immuntherapie als auch die Impfung häufig erbrachte Leistungen im Praxis- und Klinikalltag darstellen, kommt den durch sie provozierten möglichen Interaktionen in der Labordiagnostik besondere Bedeutung zu.

Hinsichtlich der im Rahmen der Influenza-A/H1N1v-Pandemie häufig durchgeführten serologischen Diagnostik und der aus dem Ergebnis für den Patienten abgeleiteten Konsequenzen, z.B. Hausquarantäne bzw. Isolierung [33], sollten die Testresultate im HHT kritisch betrachtet werden, insbesondere im Kontext mit autoimmunologischen Grunderkrankungen und Lymphomen.

Literatur

1. Carlsson B, Hanson HS, Wassermann J, Brauner A. Evaluation of the fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-Abs) test specificity. *Acta Derm Venereol* 1991;71:306–11.
2. Brauner A, Carlsson B, Sundkvist G, Ostenson CG. False-positive treponemal serology in patients with diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1994;8:57–62.
3. Erickson CP, McNiff T, Klausner JD. Influenza vaccination and false positive HIV results. *N Engl J Med* 2006;354:1422–3.
4. Hsia J. False-positive ELISA for human immunodeficiency virus after influenza vaccination. *J Infect Dis* 1993;167:989–90.
5. Mac Kenzie WR, Davis JP, Peterson DE, Hibbard AJ, Becker G, Zarvan BS. Multiple false-positive serologic test for HIV, HTLV-1 and hepatitis C following influenza vaccination. *J Am Med Assoc* 1991;268:1015–7.

6. Park JM, Shin JI, Lee JS, Jang YH, Kim SH, Lee KH, et al. False positive immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus in child with infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus infection. *Yonsei Med J* 2009;50:713–6.
7. Faix RG. Cytomegalovirus antigenic heterogeneity can cause false-negative results in indirect hemagglutination and complement fixation antibody assays. *J Clin Microbiol* 1985;22:768–71.
8. Berth M, Bosmans E. Acute parvovirus B19 infection frequently causes false-positive results in Epstein-Barr virus- and herpes simplex virus-specific immunoglobulin M determination done on the liaison platform. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:372–5.
9. Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* 2004;25:105–20.
10. Allwinn R, Geiler J, Berger A, Cinatl J, Doerr HW. Determination of serum antibodies against swine-origin influenza A virus H1N1/09 by immunofluorescence, haemagglutination inhibition, and by neutralization tests: how is the prevalence rate of protecting antibodies in humans? *Med Microbiol Immunol* 2010;199:177–21.
11. Allwinn R, Preiser W, Rabenau H, Buxbaum S, Stürmer M, Doerr HW. Laboratory diagnosis of influenza–virology or serology? *Med Microbiol Immunol* 2002;91:157–60.
12. Weber B, Brunner M, Preiser W, Doerr HW. Evaluation of 11 enzyme immunoassays for the detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr virus. *J Virol Methods* 1996;57:87–93.
13. Weber B, Fall EM, Berger A, Doerr HW. Screening of blood donors for human cytomegalovirus (HCMV) IgG antibody with an enzyme immunoassay using recombinant antigens. *J Clin Virol* 1999;14:173–81.
14. N Latex RF Kit, Verfahrensanweisung, Fa. Siemens, April 2008.
15. Doerr HW, Gerlich W. Viruskrankheiten. In: Thomas L. Labor und Diagnose, 7. Auflage, Frankfurt: TH-Books, 2008.
16. Fritsch P. Dermatologie, Venerologie, 2. Auflage, Heidelberg: Springer, 2004.
17. Hessel EM, Chu M, Lizcano JO, Chang B, Herman N, Kell SA, et al. Immunostimulatory oligonucleotides block allergic airway inflammation by inhibiting Th2 cell activation and IgE-mediated cytokine induction. *J Exp Med* 2005;202:1563–73.
18. Hibbert RG, Teriete P, Grundy GJ, Beavil RL, Reljic R, Holers VM, et al. The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. *J Exp Med* 2005;202:751–60.
19. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1025–34.
20. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 2006;116:146–55.
21. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008;226:205–18.
22. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
23. Neuber K, Mähns B, Hübner C, Gergely H, Weichenthal M. Autoantibodies against CD28 are associated with atopic diseases. *Clin Exp Immunol* 2006;146:262–9.
24. Simonsen L, Buffington J, Shapiro CN, Holman RC, Strine TW, Grossmann BJ, et al. Multiple false reactions in viral antibody screening assay after influenza vaccination. *Am J Epidemiol* 1995;141:1089–96.
25. Cassoux N, Giron A, Bodaghi B, Tran TH, Baudet S, Davy F, et al. IL-10 measurement in aqueous humor for screening patients with suspicion of primary intraocular lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3253–9.
26. Coupland SE, Chan CC, Smith J. Pathophysiology of retinal lymphoma. *Ocul Immunol Inflamm* 2009;7:227–37.
27. Voorzanger N, Touitou R, Garcia E, Delecluse HJ, Rousset F, Joab I, et al. Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced in vivo by non-Hodgkin’s lymphoma cells and act as cooperative growth factors. *Cancer Res* 1996;56:5499–505.
28. Blay JY, Burdin N, Rousset F, Lenoir G, Biron P, Philip T, et al. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin’s lymphoma: a prognostic factor. *Blood* 1993;82:2169–74.
29. Whitcup SM, Stark-Vancs V, Wittes RE, Solomon D, Podgor MJ, Nussenblatt RB, et al. Association of interleukin 10 in the vitreous and cerebrospinal fluid and primary central nervous system lymphoma. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1157–60.
30. Stasi R, Zinzani PL, Galieni P, Lauta VM, Damasio E, Dispensa E, et al. Prognostic value of serum IL-10 and soluble IL-2 receptor levels in aggressive non-Hodgkin’s lymphoma. *Br J Haematol* 1994;88:770–7.
31. Bohlen H, Kessler M, Sextro M, Diehl V, Tesch H. Poor clinical outcome of patients with Hodgkin’s disease and elevated interleukin-10 serum levels. *Ann Hematol* 2000;79:110–3.
32. Ohshima K, Suzumiya J, Akamuta M, Takeshita M, Kikuchi M. Human and viral interleukin-10 in Hodgkin’s disease, and its influence on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Int J Cancer* 1995;62:5–10.
33. RKI, RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten: Merkblätter für Ärzte. *Influenza* 21.12.2009.